

Validação de Métodos para Determinação de Zearalenona e Fumonisinhas Totais por Fluorimetria em Amostras Reduzidas de Milho



ISSN 1679-0154
Novembro, 2013

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 86

Validação de Métodos para Determinação de Zearalenona e Fumonisinhas Totais por Fluorimetria em Amostras Reduzidas de Milho

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro
Valéria Aparecida Vieira Queiroz
Cassiano Lino dos Santos Costa
Rodrigo Vêras da Costa

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,

Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda

de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Paulo Eduardo A. Ribeiro

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Validação de métodos para determinação de zearalenona e fumonisinas totais por fluorimetria em amostras reduzidas de milho / Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

28 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 86).

1. Micotoxina. 2. Resíduo. 3. Fungo. 4. *Zea mays*. I. Ribeiro, Paulo Eduardo de Aquino. II. Série.

CDD 579 (21. ed.)

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	12
Amostras de Milho	12
Fortificação de Amostras com Padrões	12
Solventes, Reagentes, Equipamentos e Outros	
Materiais	13
Extração e Análise de Micotoxinas	13
Parâmetros de Validação	14
Resultados e Discussão	17
Repetitividade	17
Recuperação	18
LD e LQ	19
Linearidade	20
Faixa de Trabalho	22
Estabilidade	22
Conclusões	23
Agradecimentos	24
Referências	24

Validação de Métodos para Determinação de Zearalenona e Fumonisinhas Totais por Fluorimetria em Amostras Reduzidas de Milho

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro¹

Valéria Aparecida Vieira Queiroz²

Cassiano Lino dos Santos Costa³

Rodrigo Vêras da Costa⁴

Resumo

Dois métodos para determinação de micotoxinas em grãos de milho foram internamente validados com base nos critérios: limite de detecção (LD), limite de qualificação (LQ), linearidade, recuperação, repetitividade e estabilidade. Zearalenona e fumonisinas foram extraídas a partir de quantidades reduzidas de amostra, passadas através de colunas de imunoafinidade específicas, eluídas e quantificadas em fluorímetro. Para a zearalenona, LD e LQ foram 0,02 mg kg⁻¹ e 0,07 mg kg⁻¹, respectivamente, a recuperação das amostras fortificadas de milho foi maior do que 78%, o coeficiente de variação (CV) foi

¹Químico, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo na área de uso sustentável de Recursos Naturais, Sete Lagoas, MG, paulo.eduardo@embrapa.br

²Nutricionista, D.Sc. em Produção Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, valeria.vieira@embrapa.br

³Bacharel em Química, Técnico de Laboratório no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, Belo Horizonte, MG, cassianolino@bol.com.br

⁴Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

de 4,9% e uma correlação linear foi encontrada entre as leituras e os níveis de fortificação, com coeficiente de correlação $r = 0,997$. Para fumonisinas totais, os resultados foram $LD = 0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, $LQ = 1,9 \text{ mg kg}^{-1}$, recuperação = 88%, $CV = 17\%$ e $r = 0,977$. A estabilidade da análise de fumonisinas totais foi avaliada e constatada por um período de tempo de pelo menos três meses, em um nível de significância de 5%. Os resultados são satisfatórios, tendo em vista a nova regulamentação brasileira sobre o assunto. A redução em 80% na massa das amostras e outros ajustes feitos na rotina da análise em relação ao método de referência foram aprovados para fins de pesquisa, levando a uma economia substancial de reagentes e a uma redução substancial na geração de resíduos perigosos contendo metanol.

Palavras-chave: colunas de imunoafinidade, micotoxinas, resíduos perigosos, *Zea mays*

Validation of Methods for Zearalenone and Total Fumonisin Determinations by Fluorometry from Reduced Mass Maize Samples

*Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro*¹

Valéria Aparecida Vieira Queiroz²

Cassiano Lino dos Santos Costa³

Rodrigo Vêras da Costa⁴

Abstract

Two methods for mycotoxin determinations in maize grains were single-laboratory validated based on the criteria: limit of detection (LOD), limit of qualification (LOQ), linearity, recovery, repeatability and stability. Zearalenone and total fumonisins were extracted from reduced amounts of sample, passed through specific immunoaffinity columns and quantified by fluorometer. To zearalenone, LOD and LOQ were 0.02 mg kg⁻¹ and 0.07 mg kg⁻¹ respectively, the recovery of spiked maize samples was greater than 78%, the coefficient of variation (CV) was 4.9% and a linear correlation was found with coefficient of correlation $r = 0.997$. To total fumonisins the results were LOD = 0.6 mg kg⁻¹, LOQ = 1.9 mg kg⁻¹, recovery = 88%, CV = 17% and $r = 0.977$. Stability of the fumonisin analysis was observed in repetitions over time at a 5% significance level. The results are satisfactory, considering the regulation of Brazil and USA, but not to EC in LQ parameter. The reduction in 80% of samples amount and other adjustments in routine were approved

to research proposes, leading to a substantial economy of reagents and reduction of hazardous residues generation.

Keywords: hazardous residues, immunoaffinity columns, mycotoxins, method validation, Zea mays

Introdução

O milho é um dos três cereais mais produzidos no mundo e o Brasil é o terceiro maior produtor, atrás da China e dos Estados Unidos da América (CONAB, 2011). Em 2010, a área de plantio de milho do Brasil foi de cerca de 14 milhões de hectares, o que gerou uma média de 58,9 milhões de toneladas de milho. Este cereal é usado para muitas finalidades, como a alimentação animal, usos industriais e ainda é o alimento básico em muitos países em desenvolvimento.

No entanto, o milho é altamente suscetível a fungos toxigênicos, principalmente os dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Em geral, as condições favoráveis para a infecção fúngica incluem alta temperatura, estresse hídrico e estresse devido a danos por insetos (MUNKVOLD, 2003). Assim, as condições climáticas do Brasil, especialmente em suas regiões tropicais, podem proporcionar um aumento de incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho, representando um grave problema para o país (QUEIROZ et al., 2011). As micotoxinas consideradas de maior importância no mundo são: aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina e zearalenona (WILD; GONG, 2010).

As fumonisinas são diésteres do ácido 1,2,3-tricarboxílico propanoico, semelhantes a esqueletos de aminopolióis de cadeia longa (HUMPF; VOSS, 2004). Elas são o grupo de micotoxinas mais encontradas no milho, embora também sejam detectadas em outros alimentos, tais como sorgo, aspargos, arroz, feijão e cervejas (PHUONG, 2010). As fumonisinas são conhecidas por causar várias doenças nos animais como o leucoencefalomalácia em equinos e edema pulmonar em suínos. Elas também têm sido relatadas como indutoras de tumores renais e do fígado em roedores e são classificadas como Grupo 2B “possivelmente cancerígeno para os seres humanos” (WILD; GONG, 2010).

A zearalenona é uma toxina estrogênica e a segunda micotoxina mais frequentemente encontrada no milho (NOLLET, 2000), mas pode também ser detectada em outros cereais, tais como aveia, cevada, trigo e sorgo (BENNETT; SHOTWELL, 1979). Se presentes acima de determinados níveis na alimentação, zearalenona pode afetar o sistema reprodutivo, causando hiperestrogenismo em fêmeas (DESJARDINS et al., 2003).

Em novembro de 2001, o Food and Drug Administration (FDA), órgão dos Estados Unidos da América, publicou uma orientação estabelecendo os níveis de fumonisinas máximos considerados como adequados para proteger a saúde humana e animal (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001) (Tabela 1). Nenhuma orientação para zealerona foi encontrada em publicações do FDA.

Desde outubro de 2007, o Regulamento da União Europeia N° 1126/2007 (EUROPEAN COMMISSION, 2007) alterou o Regulamento n° 1881/2006 (EUROPEAN COMMISSION, 2006)

e estabeleceu os limites regulamentares para sete grupos de micotoxinas e outros contaminantes, incluindo fumonisinas (soma de B1 e B2) e zearalenona, para o milho não processado (Tabela 1).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou, recentemente, níveis máximos de seis grupos de micotoxinas, com aplicação progressiva, a partir de fevereiro de 2011 até janeiro 2016 (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Níveis máximos tolerados de zearalenona e fumonisinha B1 e B2 em grãos de milho

Órgão Regulador ^a	Níveis máximos tolerados Zearalenone (mg kg ⁻¹)	Níveis máximos tolerados Fumonisin B1 e B2 (mg kg ⁻¹)
ANVISA	0,400 ^{b,d}	5,000 ^{b,d}
CE	0,200 ^b	2,000 ^b
FDA	ND	4 ^c

^a ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; CE: Comissão Europeia; FDA: Food and Drug Administration; ^b milho não processado;

^c milho limpo destinado para produção de massa; ^d limites aplicáveis após janeiro/2014; ND: Dados não disponíveis; Obs.: a notação do número de algarismos significativos dos níveis máximos tolerados mostrados acima respeitou o que foi indicado em suas respectivas fontes.

Metodologias rápidas e de baixo custo para análise de micotoxinas em milho são necessárias para atender à crescente demanda do setor de pesquisa e produção. A sensibilidade para detectar as toxinas em níveis mais baixos do que os limites estabelecidos e a confiabilidade dos métodos devem ser os principais objetivos a serem alcançados.

Existem vários métodos para a determinação das micotoxinas, tais como cromatografia em fase gasosa, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, cromatografia de camada fina e de coluna, kits ELISA e fluorescência de imunoafinidade (KRSKA; JOSEPHS, 2000; TAKINO et al., 2011). Automação, alta sensibilidade e especificidade são as principais vantagens dos métodos cromatográficos de alta performance. No entanto, a execução instrumental e a manutenção destes sistemas envolvem custos elevados e analistas bem treinados.

Neste contexto, os métodos usando coluna de imunoafinidade e detecção por fluorescência foram adotados na Embrapa Milho e Sorgo, com a intenção de suprir uma demanda de um grande número de análises da pesquisa para as micotoxinas mais importantes detectadas no milho: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina e zearalenona. O método é simples, permitindo a realização de até 32 análises completas por dia (oito horas) por analista. Os procedimentos utilizando essas colunas já foram validados anteriormente pela Vicam, sua fornecedora, em relação ao procedimento utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (VICAM, 1999, 2000).

Devido a alguns ajustes de ordem prática feitos pela equipe do Laboratório de Micotoxinas e registrados em protocolos de laboratório - especialmente a redução da massa de amostra e do volume de solventes da extração - o objetivo deste trabalho foi revalidar internamente os métodos de análise das micotoxinas mais recorrentes em milho: fumonisinas totais e zearalenona. Redução de custos e minimização da geração de resíduos perigosos têm motivado redução de escala de experiências e protocolos (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2002). Dessa forma, na presente validação, a quantidade

de amostras e solventes de extração foi proporcionalmente reduzida em 80% dos valores indicados nos procedimentos iniciais da Vicam.

Materiais e Métodos

Amostras de Milho

Como não havia disponibilidade de amostra livre de fumonisinas em quantidade suficiente para todas as análises da validação, todos os testes, com exceção da estabilidade, foram realizados utilizando uma amostra com o menor teor de fumonisinas encontrado em um experimento de campo realizado na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, que foi previamente analisada pelo método validado pela Vicam ($1,43 \text{ mg kg}^{-1}$). Uma amostra de grãos de milho naturalmente contaminados com um teor maior de fumonisinas e previamente analisada ($4,38 \text{ mg kg}^{-1}$) foi utilizada nos testes de estabilidade. Nenhuma das amostras possuía contaminação natural com zearalenona. As amostras foram secadas a 60°C durante 96 horas e homogeneizadas individualmente por quarteamentos sucessivos. Elas foram moídas num moinho de martelos (Trapp - modelo TRF 90), autoclavadas a 120°C para eliminar fungos que poderiam produzir micotoxinas após o início dos testes e secadas novamente a 80°C . As amostras foram armazenadas a -18°C até o momento das análises.

Fortificação de Amostras com Padrões

Às amostras moídas de grãos de milho (10 g) foram adicionadas as quantidades apropriadas de padrões de micotoxinas para se obterem as concentrações testadas na validação (Tabela 2). As

amostras foram secadas em estufa a 40 °C durante 3 dias, para permitir a evaporação total do solvente e para estabelecer o equilíbrio entre as micotoxinas e a matriz da amostra (SULYOK et al., 2006).

Solventes, Reagentes, Equipamentos e Outros Materiais

Todos os solventes e reagentes usados foram de grau *para análise*, salvo o metanol utilizado na eluição final da coluna de imunoafinidade, que foi de grau *HPLC*. Os revedores e as colunas de imunoafinidade Zearalatest® e Fumonitest® foram adquiridos da Vicam (Watertown, MA, EUA). Os padrões de zearalenona (100,8 mg L⁻¹) e uma mistura de fumonisina B1 e B2 (total de 100,3 mg L⁻¹) foram adquiridos da Romer Labs (Tulln, Áustria). Todas as transferências de soluções foram feitas utilizando micropipetas Gilson (Middleton, WI, EUA). Um Fluorímetro Vicam Serie-4 foi usado nas determinações das micotoxinas e as concentrações finais de micotoxinas nas amostras em mg kg⁻¹ de grãos foram calculadas diretamente pelo software Vicam V 1.3 Redy do próprio equipamento.

Extração e Análise de Micotoxinas

Grãos de milho moídos (10 g) foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados ao erlenmeyer cloreto de sódio (1 g) e solução metanol em água a 80% v/v (20 mL). O frasco foi fechado com filme plástico e agitado horizontalmente em mesa agitadora durante 2 minutos a 200 rpm. A suspensão foi filtrada utilizando papel qualitativo. A uma alíquota da solução filtrada (5 mL) foi adicionada solução PBS/Tween (20 mL). Esta solução, depois de homogeneizada,

foi filtrada através de uma membrana de microfibras de 1 μm de poro. Esta solução foi transferida para uma seringa de vidro até o volume de 8 mL (para zearalenona) ou 10 mL (para fumonisinas), previamente conectada à coluna de imunoafinidade específica (Zearalatest® ou Fumonitest®). A solução foi passada através da coluna por gravidade (1-2 gotas por segundo). Depois disso, a coluna foi lavada duas vezes com PBS/Tween (2x10 mL) e com água deionizada (10 mL). As soluções passadas através da coluna, bem como as suspensões de extração, foram descartadas em um frasco devidamente rotulado como “resíduo perigoso”, de acordo com o padrão estabelecido pelo Grupo de Gerenciamento de Resíduos de Laboratório (GERELAB).

Os resíduos de água e de solução de PBS/Tween na coluna foram drenados utilizando uma bomba de aquário doméstico. As micotoxinas retidas na coluna foram eluídas lentamente (1 gota por segundo) com metanol grau HPLC (1 mL) para uma cubeta de vidro limpa. O revelador específico foi adicionado (1 mL) e a concentração de zearalenona ou totais fumonisinas foi determinada em mg kg^{-1} , após o tempo de revelação (300 segundos para zearalenona e 240 segundos para fumonisinas), no fluorímetro previamente calibrado.

Parâmetros de Validação

A repetitividade foi definida pelo coeficiente de variação (CV) obtido para amostras fortificadas com padrões comerciais a 0,500 mg kg^{-1} para a zearalenona e a 2,00 mg kg^{-1} para o total de fumonisinas (B1 + B2), analisadas em dez repetições. Foi estabelecido que o valor máximo aceitável para o CV seria de

25% para zearalenona e de 20% para o total de fumonisinas (BRASIL, 2006).

A recuperação foi determinada de duas formas: considerando a interferência da matriz (milho), utilizando os dados do ensaio de repetitividade e desconsiderando a matriz, por adição da solução contendo padrão de micotoxinas em erlenmeyer sem a matriz (milho moído). Em atendimento a recomendação do Grupo de Trabalho de Micotoxinas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2006), este parâmetro deve estar na faixa entre 70%-120% de recuperação para zearalenona e entre 70%-110% de recuperação para fumonisinas totais, nas concentrações testadas.

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram estabelecidos como 10x e 3x, respectivamente, o valor do desvio padrão obtido para a amostra contendo a menor concentração de micotoxina que atenda ao critério de repetitividade estabelecido pelo Mapa, conforme descrito acima. Por não se tratar de uma análise que será utilizada em fiscalização, comercialização ou exportação, mas apenas para fins de pesquisa, o valor alvo estabelecido para o LQ foi o menos rigoroso entre os limites estabelecidos pelos órgãos reguladores levantados, que no caso é o da Anvisa (Tabela 1).

A linearidade foi estudada nas faixas de 0,100 a 2,00 mg kg⁻¹ de zearalenona e 0,500 a 10,0 mg kg⁻¹ de fumonisinas totais (Tabela 2). Cada curva foi construída utilizando cinco pontos, sendo que cada ponto foi obtido pela média das cinco repetições independentes. Apesar de não haver recomendação sobre esse parâmetro nos documentos aqui referenciados, será buscado um coeficiente de correlação superior a 0,90.

Tabela 2. Concentração de micotoxinas em amostras fortificadas

Ponto da curva	Concentração de zearalenona (mg kg ⁻¹)	Concentração de fumonisinias totais (mg kg ⁻¹)
1	0,100	0,500
2	0,200	1,00
3	0,500	2,00
4	1,00	6,50
5	2,00	10,0

A faixa de trabalho terá como limite inferior o LQ e como limite superior o maior valor da curva de linearidade que puder ser incluído na curva sem perda de resposta do equipamento (distribuição aleatória em torno da curva de regressão). A meta para esse parâmetro é que os valores limites determinados pelos órgãos reguladores (Tabela 1), em especial os da Anvisa (BRASIL, 2011), estejam contemplados nas faixas de trabalho dos dois métodos validados.

O experimento de estabilidade foi planejado e realizado com a intenção de se definir o limite de tempo para analisar uma amostra naturalmente contaminada com micotoxinas sem perda, durante o armazenamento, dos níveis inicialmente determinados. Na determinação inicial, não foi detectada zearalenona na amostra selecionada para esse experimento e a concentração de fumonisinias totais era 4,38 mg kg⁻¹. Nenhuma amostra naturalmente contaminada com zearalenona foi encontrada com massa suficiente para este experimento e, por isso, a estabilidade da zearalenona não foi estudada. A amostra contaminada naturalmente com fumonisinias, analisada no tempo zero (T_0) foi repetida após 7, 30, 60 e 90 dias da análise inicial (T_{c1} , T_{c2} , T_{c3} e T_{c4} , respectivamente), em cinco

repetições independentes, todas seguindo o procedimento completo (pesagem de amostra, extração e leitura).

Além disso, com o intuito de investigar a estabilidade das fumonisinas na solução extratora, o extrato obtido da análise inicial (T_0) foi guardado e reanalisado no mesmo dia após 1 e 2 horas da extração, no dia seguinte após 18 horas e depois de 7 dias da extração do grão (Te_1 , Te_2 , Te_3 e Te_4 , respectivamente). Até o momento da análise, as amostras e os extratos foram armazenados em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. A conservação das micotoxinas em cada parte do teste de estabilidade (análise completa e repetição do mesmo extrato) foi submetida a análise de variância (ANOVA).

Resultados e Discussão

Repetitividade

Os coeficientes de variação (CV) das repetições realizadas no mesmo dia pelo mesmo analista variaram de 4,9% (com matriz) a 17% (sem matriz) para zearalenona e de 10% (sem matriz) a 17% (com matriz) para fumonisinas totais (Tabela 3). Os valores obtidos por esse parâmetro estão próximos aos obtidos nas validações dos métodos originais, quando se obteve CV de 13% para zearalenona fortificada a $1,0\text{ mg kg}^{-1}$ (VICAM, 2000) e CV de 8% para fumonisinas totais (fortificada a $2,5\text{ mg kg}^{-1}$) (VICAM, 1999). Uma vez que os valores de CV obtidos, que equivalem ao desvio padrão relativo, estão abaixo dos valores de referência estabelecidos pelo Mapa (25% para zearalenona e 20% para fumonisinas totais), foram considerados aceitáveis para ambos os métodos, demonstrando que eles são reprodutíveis.

Recuperação

Para ambos os métodos, a recuperação foi satisfatória (Tabela 3) no que diz respeito às recomendações do Mapa, e comparáveis aos métodos cromatográficos, através dos quais Paepens et al. (2005) obtiveram 84% e 78% para fumonisinas B1 e B2, respectivamente, enquanto Cavaliere et al. (2007) obtiveram 90% de recuperação para fumonisinina B1, 93% para B2 e 96% para zearalenona. Sem efeito de matriz, os valores de recuperação ficaram bem próximos de 100%, demonstrando a eficácia das colunas de imunoafinidade e os passos de leitura em fluorímetro. Por outro lado, quando a matriz de milho estava presente, houve diminuição da recuperação em 22% para a zearalenona e de 12% para as fumonisinas, provavelmente devido a perdas no processo de extração, devido à interação das micotoxinas com os compostos do milho, como o amido. No entanto, mesmo com a presença da matriz (milho) as recuperações foram mantidas acima de 70%, limite estabelecido para ambas as micotoxinas nas concentrações trabalhadas.

Tabela 3. Níveis de micotoxinas detectados em amostras de milho fortificadas e em branco sem matriz

Tipo de amostra	Zearalenona (fortificada a 0,500 mg kg ⁻¹)			Fumonisinhas totais (fortificadas a 2,00 mg kg ⁻¹)		
	Média±DP	CV (%)	Recuperação (%)	Média±DP	CV (%)	Recuperação (%)
Branco (sem matriz)	0,53±0,09	17	106	2,04±0,2	10	102
Milho fortificado	0,41±0,02	4,9	82 ^a 78 ^b	1,80±0,3	17	90 ^a 88 ^b

^a Determinada sobre o valor de fortificação; ^b determinada sobre a amostra em branco sem a presença da matriz (milho); CV = Coeficiente de variação; DP = Desvio padrão

LD e LQ

Os valores de LD e LQ obtidos para zearalenona foram 0,02 mg kg⁻¹ e 0,07 mg kg⁻¹, respectivamente, e para fumonisinhas totais foram 0,6 mg kg⁻¹ e 1,9 mg kg⁻¹, todos eles abaixo dos limites máximos de micotoxinas tolerados em milho, segundo resolução da Anvisa. Assim, estes parâmetros foram considerados satisfatórios no que diz respeito às normas brasileiras e aprovados na validação.

Apesar de terem sido obtidos de forma diferente, os valores de limite de detecção são comparáveis aos obtidos na validação dos métodos originais, que foram 0,10 mg kg⁻¹ para zearalenona

(VICAM, 2000) e $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ para fumonisinias totais (VICAM, 1999).

Para ambos os analitos, os coeficientes de variação das amostras de menor concentração analisadas ficaram abaixo dos máximos estabelecidos pelo Mapa, indicando que, se houver interesse, ainda é possível explorar concentrações mais baixas, para aumentar o limite inferior a faixa de trabalho do método.

Linearidade

Observou-se uma curva linear entre a leitura de fluorescência e a concentração de zearalenona fortificada (Figura 1), com um coeficiente correlação $r = 0,997$, acima do valor planejado e próximo do valor obtido pelo método original ($r=0,999$) para a faixa de 0 a $5,00 \text{ mg kg}^{-1}$ (VICAM, 2000). Um coeficiente mais baixo foi obtido a partir da curva de fumonisinias ($r = 0,977$) em comparação com o valor do método original ($r = 0,998$) (VICAM, 1999), indicando um ajuste um pouco menor dos pontos à curva (Figura 2). Em ambas as figuras, observa-se que a distribuição dos pontos foi aleatória em torno da curva de regressão.

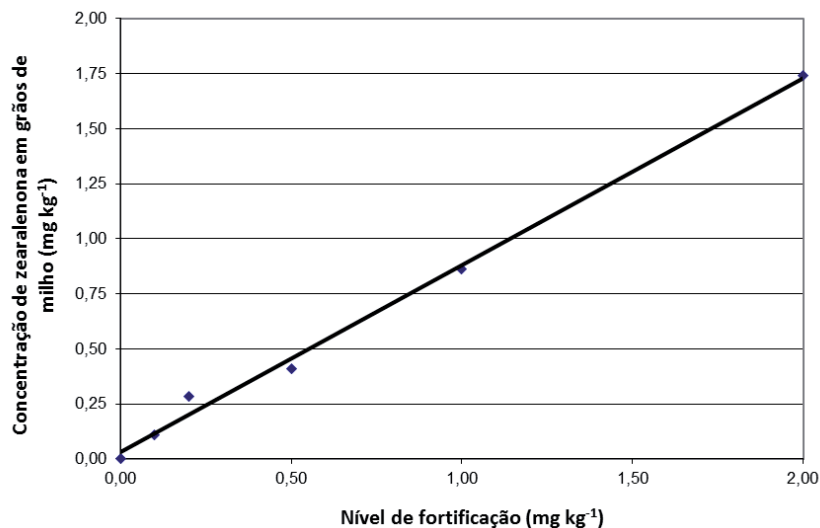


Figura 1. Correlação entre o nível de fortificação de amostras de grãos de milho com padrão de zearalenona e suas respectivas leituras fluorimétricas.

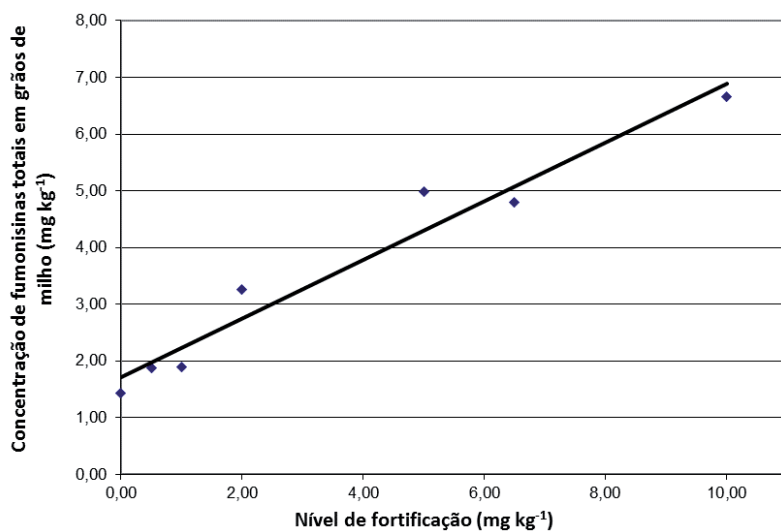


Figura 2. Linearidade entre o nível de fortificação de amostras de grãos de milho com padrão de fumonisinas e suas respectivas leituras fluorimétricas.

Faixa de Trabalho

Considerando os valores de LQ e as curvas de regressão, a faixa de trabalho definida para a análise de zearalenona foi 0,07 mg kg⁻¹ a 2,00 mg kg⁻¹ e para fumonisinas totais de 1,9 mg kg⁻¹ a 10,0 mg kg⁻¹. São faixas consideradas adequadas quando se consideram os valores limites da Anvisa de 0,40 mg kg⁻¹ para zearalenona e 5,0 mg kg⁻¹ para fumonisinas totais.

Estabilidade

A um nível de significância de 5%, o teste ANOVA permitiu concluir que não houve diferença significativa entre os valores médios de análises independentes de fumonisinas totais durante três meses de armazenamento de uma amostra naturalmente contaminada. O mesmo pode-se afirmar para as repetidas análises de um mesmo extrato metanólico armazenado por até sete dias em freezer (Tabela 4). Dessa forma, constatou-se a grande estabilidade das fumonisinas, tanto no grão quanto no extrato metanólico conservados a -18 °C. Esta informação pode ser usada para otimizar a rotina do laboratório, com uma sistematização de operações de extração e leituras e, conseqüentemente, com o aumento do número de análises por dia e por analista.

Tabela 4. Concentrações de fumonisin totais detectadas ao longo do tempo, em uma amostra de milho naturalmente contaminada

Análise ^a	Tempo		Concentração de fumonisin totais (mg kg ⁻¹) Média ^b	ANOVA ^c
	Dia	Hora		
T ₀	0	0	4,3	
Te1		1	4,3	CV = 6.2% F = 0.858 (NS) p>0.05
Te2		2	4,5	
Te3		18	4,2	
Te4		170	4,3	
Tc1	7		4,7	CV = 10.2% F = 2.068 (NS) p>0.05
Tc2	30		4,4	
Tc3	60		3,9	
Tc4	90		4,4	

^aTe = análises feitas a partir do extrato T₀ armazenado em freezer, Tc = análises completas (pesagens e extrações independentes); ^b Média de cinco repetições independentes; ^c Ambos os testes usaram T₀ como análise inicial; CV = coeficiente de variação, F = fator de variância, NS = não significativo, p = nível de significância

Conclusões

Os resultados obtidos para os parâmetros de validação estudados indicam que o método é adequado para o uso pretendido, ou seja, para a quantificação de zearalenona e fumonisin totais em amostras de grãos de milho para fins de pesquisa, tendo como base os limites estabelecidos pelas recomendações do Grupo de Trabalho de Micotoxinas do Mapa. Isso significa que as modificações feitas no método original podem ser incorporadas de maneira definitiva nos protocolos

de análises do Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo. Os limites dos métodos aqui validados para quantificar zearalenona e fumonisinas totais estão, ainda, de acordo com os limites máximos tolerados segundo recomendações da Anvisa. Por se tratar de uma análise pouco complexa e rápida, é muito aplicável a trabalhos de *screening*, por exemplo, quando parte-se de um grande número de amostras de programas de melhoramento. No entanto, em situações onde sejam necessários métodos mais sensíveis, deve-se lançar mão de métodos mais apurados, como cromatografia líquida e espectrometria de massas, ainda que eles tornem a análise mais demorada e onerosa. Devido à elevada estabilidade das fumonisinas, as amostras de milho contendo essas micotoxinas podem ser armazenados por até três meses sem perda de performance, assim como seus extratos por até sete dias. A redução da quantidade de amostras e reagentes implementada nessa validação permitiu uma redução de 80% no consumo de solventes e na geração de resíduos perigosos na etapa de extração.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido para esta pesquisa pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Referências

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Task Force on Laboratory Environment, Health, & Safety. **Less is better**: guide to minimizing waste in laboratories. Washington, 2002. Disponível

em: <http://portal.acs.org/portal/fileFetch/C/WPCP_012290/pdf/WPCP_012290.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2004.

BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Zearalenone in cereal grains. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 56, p. 812-819, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal**: relatório 2006. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/MAPA.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=72&data=22/02/2011>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by Fusarium genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 105, p. 700-710, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, décimo primeiro levantamento. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011..pdf>. Acesso em: 10 ago. 2011.

DESJARDINS, A.; MARAGOS, C.; NORRED, W.; PESTKA, J.; PHILLIPS, T.; VARDON, P.; WHITAKER, T.; WOOD, G.; EGNOND, H. van. **Mycotoxins: risk in plant, animal, and human systems**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. (Task Force Report, 139).

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation number 1881 of 19 december 2006: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364, p. 5-24, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation n° 1126 of 28 september 2007: amending Regulation (EC) n° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. **Official Journal of the European Union**, L 255, p. 14-17, 2007.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 48, p. 255-269, 2004.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 516-521, 2006.

KRSKA, R.; JOSEPHS, R. Analysis of deoxynivalenol and zearalenone: state-of-the-art in Europe. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 16, p. 213-216, 2000.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of Fusarium disease and their mycotoxins in maize. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 705-713, 2003.

NOLLET, L. M. L. **Food analysis by HPLC**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000.

PAEPENS, C.; DE SAEGER, S.; VAN POUCKE, C.; DUMOULIN, F.; VAN CALENBERGH, S.; VAN PETEGHEM, C. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B1, B2 and B3 in cornflakes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, p. 2021-2029, 2005.

PHUONG, N. H. **Mycotoxins contamination in maize kernels in Vietnam and effects of feed additives on reducing fumonisin impacts in pigs**. 2010. Thesis (MSc.) - Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; FERREIRA, P.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; MENDES, S. M.; COSTA, R. V.; RIBEIRO, P. E. A. Fumonisin incidence in maize stored in family farms cribs in the Central Region of the State of Minas Gerais. In: CIOSTA CIGR V CONFERENCE, 34., 2011, Viena. **Efficient and safe production processes in sustainable agriculture and forestry**: [proceedings]. Viena: University of Natural Resources and Applied Life Sciences, 2011. p. 116-118.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of

39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 20, p. 2649-2659, 2006.

TAKINO, M.; TANAKA, H.; TANAKA, T. Multi mycotoxin analysis in food products using immunoaffinity extraction. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 747, p. 259-266, 2011.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds: final guidance**. Rockville, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm109231.htm>>. Acesso em: 09 jun. 2011.

VICAM. **Validation protocol for fumonitest fluorometer procedure for corn**. [S.l.], 1999. VP-1013-6.

VICAM. **Zearalatest fluorometer validation protocol for corn**. [S.l.], 2000. GN-P1035.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, p. 71-82, 2010.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

